

**Caracterización molecular y serológica de *Leptospira* spp de roedores
sinantrópicos y aguas superficiales. Turbo, Colombia. 2011**

Ingrid Lorena Jaramillo Delgado

**Trabajo de investigación para optar al título de Magister en Microbiología y
bioanálisis**

Asesora

**Piedad Matilde Agudelo Flórez. Bióloga, PhD en ciencia biomédicas
Profesora Universidad CES**

**Universidad de Antioquia
Facultad de microbiología y bioanálisis
Medellín
2013**

Tabla de contenido

Resumen	1
1. Introducción	4
2. Materiales y métodos	5
3. Resultados	13
4. Discusión	21
Referencias bibliográficas	23

Caracterización molecular y serológica de *Leptospira* spp de roedores sinantrópicos y aguas superficiales. Turbo, Colombia. 2011

INGRID LORENA JARAMILLO DELGADO^{1*}, PIEDAD AGUDELO FLOREZ².

Grupo de Investigación en Medicina Tropical; Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Medellín, Colombia.

¹Médica veterinaria zootecnista, Est. M.Sc en Microbiología y Bioanálisis

² Bióloga, Ph.D en Ciencias Biomédicas

Resumen.

El municipio de Turbo ha presentado positividad en varios estudios a leptospirosis e incluso casos mortales de la enfermedad, esta enfermedad zoonótica de transmisión ambiental, presenta como su mayor hospedero reservorio los roedores, quienes liberan la bacteria al ambiente a través de orina. Este estudio confirma el importante rol que tienen estos animales y el ambiente por medio de aguas superficiales en la posible transmisión de la enfermedad a los humanos. Se evaluó positividad serológica por la prueba de microaglutinación (MAT) y molecular por secuencia del gen 16S (*rrs*) en los habitantes, roedores y fuentes hídricas de la zona. Se obtuvo positividad para MAT en 4% (11/254) de la población y en roedores un 77% (50/65), tanto humanos como roedores presentaron positividad en serogrupos pertenecientes a *L. interrogans* serogrupos Icterohaemorrhagiae y Australis y para *L. borgpeterseni* serovar Tarassovii. Con títulos entre 1:200 y 1:400. Este último título fue el más frecuente para la serovariedad Icterohaemorrhagiae. Se obtuvieron 2 aislados de roedores correspondientes a *L.interrogans* y 5 aislados de agua correspondientes a *L. meyeri* (3), *L. broomii* (1), *L.inadai* (1). En su mayoría las especies de roedores halladas fueron *Rattus* spp 88% (60/68) y *Mus* spp 12% (8/68). Se comprobó y confirmo el papel de los roedores en la transmisión y mantenimiento *Leptospira* spp y se involucró a esta transmisión la fuente de aguas superficiales, comprobando el mantenimiento en estas de la bacteria de especies intermedias y saprofitas Es posible concluir que en el municipio se presenta el círculo epidemiológico roedores/leptospirosis/ambiente, con indicadores altos de su presencia y la posibilidad de poseer otras fuentes de infección para humanos y animales. Lo anterior justifica emprender otros estudios que permitan definir el fenómeno epidemiológico con más exactitud en la zona y realizar una alerta para emprender acciones como intervención de aguas superficiales para eliminación de la bacteria, control eficaz de roedores y manejo consiente por parte de la población de factores que aumentan la proliferación de roedores como basurales y residuos en la zona.

Palabras clave: *Roedores, ambiente, Leptospira, serología, Rattus, ARN ribosómico.* .

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de transmisión ambiental, causada por las especies patógenas del género *Leptospira* (1,2). La espiroqueta se establece en el riñón de hospederos que presentan diferentes niveles de adaptación; en estos niveles se encuentran los hospederos susceptibles como son los humanos, los de adaptación intermedia como son los animales domésticos, y aquellos de alta adaptación, o reservorios biológicos de la bacteria, entre los que se encuentran roedores silvestres y sinantrópicos. Estos últimos son la principal fuente de infección para humanos por su alta capacidad de diseminación del microorganismo (3)(4). La orina infecciosa de cualquiera de los hospederos mencionados es liberada al ambiente en donde la bacteria, bajo condiciones ideales, puede sobrevivir por más de 300 días en aguas y 15-72 días en suelo (5-7). Por lo anterior, *Leptospira* spp es la causa de epidemias asociadas a una alta mortalidad en comunidades urbanas donde confluyen factores climáticos (alta pluviosidad, huracanes, inundaciones) junto a malas condiciones de higiene y salubridad las que dan cuenta del aumento de la infestación de roedores sinantrópicos a los ambientes tanto peri como doméstico (2,3,8).

Por lo anterior, un aumento en la presencia de roedores se ha asociado con incrementos en los casos de la enfermedad, emergiendo ésta como un problema de salud pública en sitios urbanos marginales de países tropicales y en desarrollo. Esta situación, es abordada por anteriores estudios donde se reconoce la asociación existente entre el complejo leptospirosis-roedor y su relación con el ambiente, como causantes de que la enfermedad en humanos en zonas urbanas latinoamericanas se perpetúe (9-13). Adicionalmente, la rápida expansión de asentamientos precarios, produce condiciones ecológicas aptas para el aumento de roedores al proporcionarles alimento, agua y refugio a reservorios que como éstos están altamente adaptados a la espiroqueta y que a su vez liberan gran cantidad de *Leptospira* patógenas en aguas superficiales, lo que se ha asociado, como es el caso de Perú, con la presentación de casos severos de la enfermedad en poblaciones urbanas (14).

En Colombia, los fenómenos de cambio climático han favorecido que después de inundaciones se hayan documentado brotes de la enfermedad en humanos (15), pero también se reconoce que la enfermedad es prevalente en población general (16-19). En la zona del Urabá Antioqueño, los dos estudios llevados a cabo en área urbana han reportado incremento progresivo a través de los años; 12,5% (19) para 9 municipios de la zona y 35% para el municipio de Necoclí (20).

En el primer estudio (19), la encuesta de prevalencia llevada a cabo en 591 personas registró, por la prueba serológica de inmunofluorescencia 73 de 591 casos positivos de los cuales 11,8% eran habitantes del municipio Turbo. En este grupo, la distribución por serovar más frecuente se presentó para las

serovariedades *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagiae*, ambas de adaptación reconocida para roedores de las especies *Mus musculus*, *Rattus Rattus* y *Rattus norvegicus* (3). Según la encuesta poblacional, se evidenció que estas tres especies, estaban ampliamente distribuidas en la zona urbana del municipio. Pero, la situación que se reportó en el anterior estudio no fue una condición temporal. Para el período 2010-2011 el municipio presentó una incidencia anual de 53 casos por 100.000 habitantes. En el mismo periodo se notificaron dos casos fatales, uno procedente del área rural y otro de la urbana (21).

Basados en las evidencias arrojadas por anteriores estudios, la presencia de la enfermedad demostrada con los casos clínicos presentes en el municipio (21) y los casos de mortalidad urbana ya mencionados, se estableció esta zona como específica para llevar a cabo un estudio descriptivo que permitiera evidenciar el papel real de los roedores y de las fuentes de aguas superficiales en la transmisión urbana de la leptospirosis. Para esto, inicialmente se realizó una encuesta serológica humana en el mismo tiempo y lugar en el que se determinó la distribución espacial de roedores y de fuentes hídricas las cuales fueron monitoreadas serológica y molecularmente para *Leptospira* spp. De esta forma poder inferir el papel potencial que juegan estos factores de riesgo como agentes causales para la presentación de la enfermedad en la población urbana del municipio de Turbo.

Materiales y Métodos

Definición y descripción de la zona de estudio

El municipio de Turbo tiene una superficie total de 3,055 km² con 11,9 Km² de zona urbana y 3043,1 Km² de zona rural. Se encuentra localizada en 8°5'53"N 76°43'54"W (Figura 1) a 2 metros sobre el nivel del mar, con una humedad relativa de 84% y una temperatura promedio de 28°C (22). Esta zona costera del golfo de Urabá destina la mayoría de sus recursos a actividades económicas como la pesca, ganadería y agricultura (23). Durante los años 2010 y 2011 se diagnosticaron 123 casos de leptospirosis procedentes del municipio de Turbo, tanto de la zona rural (42/123) como urbana (81/123).



Figura 1A.Ubicación del municipio de Turbo en la zona del Urabá Antioqueño.**2B.**Lugar de residencia del paciente fallecido durante 2010.

Adicional a estos datos, en el mes de octubre del año 2010 fue notificado un caso de mortalidad procedente de la zona urbana del municipio de Turbo que fue confirmado por clínica compatible y por serología (IgM) positiva para *Leptospira* spp. Se trató de un paciente de sexo masculino de 16 años de edad procedente del barrio Buenos Aires. La visita domiciliar llevada a cabo por funcionarios de factores de riesgo de la Secretaría de Salud municipal, evidenció presencia de roedores dentro y fuera de la residencia, el paso de un caño de aguas servidas a menos de 5 metros de la vivienda y presencia de basurales en la zona (figura 1).

Durante el mes de junio del año 2011 y basados en las evidencias de riesgo ambiental de infección por roedores y por fuentes hídricas se estableció la zona para llevar a cabo un estudio descriptivo en humanos residentes en el mismo barrio de procedencia del caso de leptospirosis fallecido.

Para realizar la definición espacial del barrio Buenos Aires se usaron mapas disponibles en planeación municipal. De acuerdo a esta información el barrio se encuentra situado en la zona central del casco urbano de Turbo, limitando con los barrios Las Flores, Manuela Beltrán, Jesús Mora y Baltazar. Según el censo del año 2005 en el barrio habitaban 5.070 personas, planeación del municipio registró 32 manzanas en el barrio. En un mapa de malla vial se ubicaron manzanas, predios, ubicación de calles, caños y fuentes de agua servidas. Este mapa fue

usado para definir la distribución por zonas para efectos de la recolección de la información y usando como base los acercamientos al área real disponible en Google Earth.

Recolección de información

La información fue recolectada mediante una encuesta domiciliaria realizada en 753 personas residentes del barrio Buenos Aires aplicada por 26 encuestadores capacitados, con el fin recolectar información sobre la presencia de roedores y la ubicación de estos. El cuestionario constó de una serie de preguntas abiertas y cerradas, siguiendo el esquema validado en otras regiones latinoamericanas (24).

Inspecciones domiciliarias para determinar el uso de la propiedad y actividad de roedores

Siete profesionales capacitados en reconocimientos de indicios, participaron en la recolección de los datos. Esta información se registró en un formulario de indicios previamente evaluado en otras regiones latinoamericanas (24). Los datos arrojados fueron digitados en Microsoft Excel[®] y luego exportados al paquete estadístico SPSS[®], versión 19,0.

La inspección se llevó a cabo por observación directa en las propiedades privadas y en espacios públicos. Se verificaron las características de uso de la propiedad y el registro de actividad de roedores (madrigueras, sendas, heces, roeduras, entre otras) y de condiciones que prestaran a estos mamíferos alimento y refugio. El número de viviendas se determinó basado en estudios similares llevados a cabo en otras regiones latinoamericanas (24), que estipulan que cuando el número de viviendas a inspeccionar en una población es menor de 1.000, debe seleccionarse de forma aleatoria el 20% de ellas para realizar la inspección. Basados en el número de viviendas del barrio, 789, el 20% correspondió a 158 viviendas a visitar. Esta muestra se ajustó en un 5% más por pérdidas, dando un número de 165 viviendas en total. Para asegurar una distribución homogénea del número de viviendas para seleccionar, este número se dividió por el número de manzanas reportadas por la oficina de planeación de Turbo (32 manzanas), arrojando un número de cinco casas por manzana.

Se utilizó el software Microsoft Excel[®] para asignar el número aleatorio de cada vivienda de las 32 manzanas, ordenándolos de mayor a menor. Se seleccionaron las primeras cinco viviendas de la lista. En el mapa disponible de la malla vial del área de estudio se demarcaron las manzanas y la dirección de las casas seleccionadas. Siendo siete los funcionarios para llevar a cabo este registro, cada funcionario tenía entre 23 y 24 casas asignadas para visitar. El trabajo de campo para el levantamiento de indicios se programó para llevarse a cabo en un período de dos días.

Caracterización de ambientes para determinar índices de abundancia de roedores

Con el objeto de delimitar el área de estudio y caracterizar los ambientes propicios para que los roedores obtuvieran refugio y alimento, se realizó una inspección de la totalidad del espacio público directamente en terreno, llevando a cabo un recorrido en cada una de las áreas físicas del barrio Buenos Aires.

La caracterización de ambientes basados en las situaciones favorables para las poblaciones de roedores observadas, determinado por la presencia de lotes baldíos. La ubicación de cada lote baldío se registró inicialmente en forma manual en el mapa disponible de la malla vial del área de estudio y adicionalmente con GPS con su correspondiente coordenada geo-espacial. Se definieron los límites ambientales del área de estudio según sus características bióticas y abióticas que se evaluaron según la disponibilidad ambiental de alimento (basureros) y refugio (lotes baldíos) para los roedores, quedando distribuida la totalidad del área del barrio Buenos Aires en cuatro ambientes diferentes que se señalan en la figura 2.



Figura 2. Mapa del barrio Buenos Aires con ubicación espacial de los ambientes definidos como fronteras abióticas y bióticas que delimitan la distribución espacial diferencial de roedores. Ambiente 1 en mostaza, ambiente 2 en verde, ambiente 3 azul y el ambiente 4 en rojo. (Tomado de fotos de satélite de Google Earth)

Índice de abundancia relativa

Según Coto, 2007, un índice es una medida que se halla relacionada de forma relativa con la abundancia real de una población de roedores y es tomado para obtener una muestra representativa de esa población (24). Para este caso, la

abundancia por especie de roedor se estimó mediante el método directo (éxito de trapeo), el cual se basa en la ponderación del número de individuos capturados mediante la utilización de un sistema de trampas durante un período de tiempo controlado (Esfuerzo de Captura: Número de trampas x Número de días que se usaron). Por lo que el índice de abundancia relativa se obtuvo de dividir el número de animales capturados por el esfuerzo de captura y este dato multiplicado por 100.

$$\text{Índice de abundancia relativa} = \frac{N^{\circ} \text{ de animales capturados}}{N^{\circ} \text{ de trampas} \times N^{\circ} \text{ de días utilizados}} \times 100$$

Determinación de los índices de abundancia relativa de roedores

Para determinar el índice, se hizo un muestreo para proporcionar estimaciones confiables sobre la abundancia de la población de roedores y conocer sus patrones de organización espacial. Fue así como se establecieron cinco estaciones de muestreo representativas de la estructura y actividad antrópica del área, cubriendo tres de los cuatro ambientes definidos de acuerdo a la inspección ambiental realizada en los espacios públicos.

Cada una de las cinco estaciones de muestreo constó de 20 puntos de captura representados mediante trampas de captura viva tipo jaula, localizados en cada ambiente y durante dos días consecutivos. Las trampas fueron ubicadas en cada estación de muestreo en forma lineal con una separación de 10-20 metros entre cada una. Se realizaron capturas desde finales de la tarde y se revisaron al día siguiente en la mañana. Para cada trampa positiva se registró especie y sexo del roedor capturado y se registró con GPS de la ubicación de esta trampa positiva con su correspondiente coordenada geo-espacial.

Muestreo para la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp en habitantes de las viviendas inspeccionadas

El tamaño de muestra se calculó usando el software Epidat[®] versión 4.0, estableciendo un nivel de confianza del 95%, un alfa del 5%, un error estándar para el estimador de la muestra del 6% según recomendaciones del asesor Héctor Coto y sus anteriores experiencias en otros estudios (24) , con una población blanco de 5.070 habitantes del barrio Buenos Aires. Se estableció un número de personas para realizarles prueba serológica de 254. Para realizar una distribución homogénea de los habitantes para toma de muestra por vivienda, este número de 254 se dividió por el número de 158 viviendas a inspeccionar para registro de indicios de presencia de roedores. De acuerdo a ese cálculo (254/158), se estableció seleccionar dos personas para toma de muestra de sangre para hacerles serología para *Leptospira* spp. La muestra fue tomada por personal de enfermería, previo consentimiento informado.

Determinación de parámetros biológicos y de infección con *Leptospira* spp de los roedores capturados

Los roedores capturados fueron extraídos de la trampa con bolsas de tela de algodón y anestesiados con una mezcla de ketamina 5% y xilazina 2% en proporción 6 en 1. De ésta mezcla se aplicaron 0,1 ml por cada 100 gr de peso vivo, adicionalmente se les aplicó Tramadol (50 mg/ml) a razón de 0,2 mg del producto por cada 100 mg de peso vivo. Todos estos medicamentos fueron aplicados intramuscularmente con jeringa de 2,5 ml (24 x 1 ½”).

Una vez anestesiado, a cada individuo se le asignó un número consecutivo de identificación el cual se registró en un rótulo que se ubicó en su extremidad posterior izquierda. Para el establecimiento de la especie, se registraron en una planilla parámetros morfométricos entre los que se cuentan: largo de cuerpo, largo de cola, extremidad posterior y extremidad anterior y adicionalmente cada espécimen fue fotografiado con una cámara digital Panasonic® 12 Mpx. A cada roedor se le tomó una muestra de sangre (1-3 ml), por punción cardiaca (Jeringa 22 x 1½”) para depositarla en tubos sin anticoagulante y fue centrifugada a 4.500 rpm durante 20 minutos para extracción de suero. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C hasta ser procesada por prueba la serológica (microaglutinación) para la determinación de anticuerpos contra *Leptospira* spp.

Posteriormente, cada roedor fue sacrificado por punción intracardiaca cuando aún se encontraba anestesiado, con Eutanex® a razón de 0,1 ml por cada 500 gramos de peso vivo. Una vez sacrificado el animal se le hizo lavado con solución yodada al 10% y luego con hipoclorito en dilución de 5000 ppm antes de hacerle disección aséptica los riñones. El derecho se maceró en solución salina pH 7,8 para realizar aislamiento de *Leptospira* spp por cultivo en medio específico de Fletcher® (1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA 07417) con el fin de realizar aislamiento de la bacteria; los cultivos fueron enviados al laboratorio del ICMT-CES, para ser monitoreados durante 8 a 12 semanas para verificar el momento de positividad para *Leptospira* spp.

Los residuos de descarte de material biológico de los roedores se empacaron en bolsas con la adecuada rotulación para someterlos a incineración y descarte por parte de la ruta hospitalaria que sirve al hospital Regional de Apartadó. Los protocolos en animales fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad CES.

Determinación de anticuerpos contra *Leptospira* spp en muestras de suero de poblaciones humanas y de roedores

Las muestras de sangre de los humanos fueron transportadas al laboratorio del ICMT – CES para ser centrifugadas. Allí se separó el suero y se conservó a -20 °C hasta su procesamiento por las pruebas serológicas para determinación de anticuerpos IgM e IgG por la prueba de inmunofluorescencia indirecta, IFI (25). Aquellas muestras de suero que resultaron positivas por IFI (IgM título mayor a

1:40, IgG título mayor a 1:80) fueron procesadas bajo MAT por métodos estándares de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (26). Dentro del panel de evaluación por MAT se incluyeron los serovares Canicola, Pomona, Hardjo, Australis Bratislava, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Ballum pertenecientes a especies patógenas de *Leptospira* y que por estudios previos se conoce que circulan en la zona de Urabá (9).

Para el caso de los sueros humanos se consideró como punto de corte la dilución en la que se obtuvo el 50% de aglutinaciones frente al control negativo. Se consideraron como títulos positivos aquellos iguales o superiores a 1:100. Según estándar del laboratorio.

Las muestras de suero de roedores fueron procesadas por MAT con las serovariedades más frecuentes halladas en humanos para el presente estudio Icterohaemorrhagiae, Bratislava y Tarassovi. Para el caso de los roedores se consideraron títulos positivos iguales o mayores a 1:50.

Determinación de positividad microbiológica de fuentes hídricas

Se tomaron 11 muestras de las fuentes hídricas con duplicado filtrado (0,22µm One Baxter Parkway Deerfield, IL 60015-4625). Estas muestras fueron georeferenciadas y tomadas de manera aleatoria en los caños de la zona de estudio. Las muestras fueron depositadas en medio específico Fletcher® (1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA 07417) y se mantuvo a los cultivos a temperatura ambiente para ser monitoreadas semanalmente por microscopía de campo oscuro durante 8-12 semanas hasta observar crecimiento de la bacteria o determinarse su estado negativo al final del tiempo de seguimiento.

Extracción de ADN en cultivos positivos

A todos los cultivos positivos de roedores y fuentes hídricas evidenciados por microscopía de campo oscuro, se les realizó extracción ADN con el Kit Wizard® Genomic DNA Purification según las instrucciones y recomendaciones del fabricante para bacterias gram-negativas (Promega UK Ltd, Southampton, UK).

La cantidad de ADN fue cuantificada midiendo su absorbancia utilizando el espectrofotómetro ND-1000 Nanodrop (3411 SilversideRd, BancroftBuilding, Wilmington, DE 19810, USA).

Reacción de cadena de la polimerasa múltiple para los genes LipL32 y 16S (rrs)

Cada ADN extraído de cultivo positivo se le realizó reacción de cadena de la polimerasa múltiple para amplificar con los iniciadores 5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3' y 5'TTCCCCCATGAGCAAGATT-3' descritos por Céspedes M, 2007 (27), dirigidos a una secuencia específica del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S; el segundo par de iniciadores 5'-

ATCTCCGTTGCACTCTTTGC-3' y 5'-ACCATCATCATCATCGTCCA-3' descritos por Ahmed en el 2006 (28), dirigidos a una región específica del gen que codifica para la proteína de membrana LipL32 altamente conservada en las especies patógenas de *Leptospira* spp (Acceso: NC_005823.1 y NC_008508.1)

El perfil térmico utilizado para la PCR fue desnaturalización a 94 °C durante cinco minutos, una fase de 35 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 54 °C durante un minuto y 72 °C durante un minuto y, posteriormente, una fase de extensión final a una temperatura de 72 °C durante cinco minutos. En el proceso de PCR se utilizaron los reactivos comerciales (Fermentas Taq DNA polymerase, Foster City, CAL. USA) usando 30 µL como volumen final de la reacción, buffer PCR (KCl) a una concentración 1X, MgCl₂ a una concentración de 2,5 mM, iniciadores (LipL32) y iniciadores (16S) a una concentración 1,0 µM, dNTP a una concentración de 0,2 mM, y taq polimerasa con una concentración de 1U agregando 3 µL de DNA molde.

Electroforesis

Todos los productos de la PCR obtenidos se visualizaron utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa, con una concentración de 1,5%, se usó buffer TBE (Tris- Base, EDTA, ácido bórico) a una concentración de 1X, fue revelado con bromuro de etidio y se usó un GeneRuler™ de 50 bp y de 100bp DNA Ladder (Fermentas, Carlsbad CA. USA). Posteriormente se realizó la corrida electroforética a 60V durante una hora en cámara de electroforesis horizontal y, por último, se visualizó en un analizador de imagen Epichemi3®.

Secuenciación

A los amplificados en donde se obtuvo producto para el gen 16S, se le realizó secuenciación capilar con ABI3730XL en la empresa Macrogen (Macrogen, Seoul 153-781, Korea). Los resultados fueron editados por consenso y alineados con el software DNA Baser® (Heracle BioSoft SRL), analizados y comparados con las múltiples secuencias publicadas en GenBank® con el programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Las secuencias fueron alineadas con CLUSTAL X (29) en MEGA v5.0. Se construyó un árbol con el método Neighbor joining y las distancias evolutivas fueron estimadas con el modelo Jukes and Cantor (30).

Análisis de la información

Todas las encuestas y datos tomados, fueron digitados en Microsoft Excel®. Se realizó revisión del 10% de las encuestas para fines de validación del dato. Una vez validados fueron exportados al paquete estadístico SPSS® versión 19.0 para su análisis por estadística descriptiva.

Con todo el registro geo-referenciado obtenido para lotes baldíos, humanos, roedores y fuentes hídricas positivas para *Leptospira* spp se generó un mapa temático usando el software ArcGis.

Aspectos éticos

Se siguieron las normas técnicas, científicas y administrativas para la investigación en salud del Ministerio de Salud de Colombia, Resolución N ° 008430 del 4 de octubre de 1993, y la declaración de Helsinki refrendada en 2004. A lo largo del estudio siempre se protegió la privacidad e intimidad del paciente, identificándolo con un número interno.

El proyecto fue aprobado y catalogado por el Comité de Ética de la Universidad CES, para la manipulación y manejo de muestras biológicas animales y humanas. Los datos obtenidos se incluyeron en una base de datos anónima. A todas las personas incluidas en este estudio se le explicó el tipo de estudio y se obtuvo su consentimiento oral, por escrito o ambos.

Resultados

Encuestas domiciliarias

El 84,0% (633/753) de los encuestados afirmó haber visto ratas en sus viviendas y el 83,0% (625/753) de las personas afirmaron implementar alguna medida no eficaz para controlar la presencia de ratas en su propiedad. La mayoría de las personas que afirmaron haber visto ratas en su propiedad, las vieron tanto dentro como fuera de ella. El 58,4% (440) de los casos las vieron al interior de las viviendas y el 24,7% (186) fuera de su propiedad.

Encuesta de inspección domiciliaria

La inspección domiciliaria fue realizada a 165 propiedades representativas de más del 20% de la totalidad de propiedades del barrio Buenos Aires. Esta inspección consistió en verificar las condiciones higiénicas y ambientales que favorecen la presencia de roedores (ratas), se observó la presencia de 90 cuevas, 46 sendas, 136 heces y 48 indicios más. Las cuevas y sendas fueron observadas en el exterior de las propiedades visitadas, mientras que las heces y otro tipo de indicios de presencia de roedores se observaron con mayor frecuencia en el interior de las propiedades. Tanto en el interior como en el exterior de las viviendas se evidenciaron cuevas, sendas, heces y otros indicios que indicaron indirectamente la presencia de roedores.

Índices de abundancia relativa de roedores

El territorio operacional del proyecto comprendió el área delimitada por la oficina de planeación municipal, ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. pero para la

caracterización de ambientes, la definición de éstos se hizo observando en terreno las fronteras abióticas y bióticas que significan obstáculos naturales para el tránsito de roedores. Basados en este criterio la caracterización de ambientes permitió definir cuatro unidades nominadas como 1, 2, 3, y 4, señaladas espacialmente y cuya descripción se presenta a continuación:

Ambiente 1 (Mostaza): Comercial: Delimitado por la carrera 12, es un sector netamente comercial, que concentra diferentes actividades desarrolladas a través de establecimientos que aparentan contar con las habilitaciones respectivas, y constituidos en construcciones de buena calidad, con los servicios básicos cubiertos. Por tratarse de un ambiente de tan solo una manzana y no ser representativo de la actividad y estructura del área diagnóstica preestablecida, se decidió excluirlo del área de trabajo y no ubicar estación de muestreo en este ambiente.

Ambiente 2 (Verde): Urbano Medio: Delimitado por la carrera 13 hasta la calle 114. Concentra viviendas urbanas de clase media, construidas de material, perfiles domiciliarios medianamente ordenados y predios bien definidos. En este ambiente se ubicó una estación de muestreo.

Ambiente 3 (Azul): Influencia del caño: Es un ambiente definible con ese nombre por conformar el área de influencia de los diferentes drenajes a cielo abierto que atraviesan el barrio. Es un ambiente dominado por diversos grados de cobertura vegetal y con construcciones mayoritariamente precarias insertas con concentración dispar en él. Puede ser descrito como un ambiente preliminarmente propicio para la actividad de *Rattus norvegicus*. En este ambiente se ubicaron dos estaciones de muestreo.

Ambiente 4 (Rojo): Urbano bajo: Delimitado desde la calle 100 hasta la 108. En él se concentra la población de bajos recursos del barrio. Las viviendas se levantan sobre terrenos marcadamente anegadizos e inestables. La madera es el material de construcción predominante en ellas, con pisos de tierra, patios desordenados son malezas y residuos como parte de su entorno. En este ambiente se ubicaron dos estaciones de muestreo.

De las capturas realizadas en las cinco estaciones establecidas se recolectaron en total 68 roedores, obteniendo un mayor número de *Rattus norvegicus* (47/68), seguido de *Rattus rattus* (13/68) y *Mus musculus* (8/68). Al calcular el índice de abundancia por género se obtiene que con un esfuerzo de captura de 205 trampas para *Rattus* (*R. rattus* y *R. norvegicus*) se obtiene un índice total de 29,26% y por su parte para *Mus* (*M. musculus*) con un esfuerzo de captura de 90 se obtiene un índice de 8,88%. El índice obtenido de *Rattus* supera en más de cinco veces el valor umbral de cinco establecidos para la región peruana por Arrieta *et al* (31) y otros autores a nivel mundial que lo han utilizado habitualmente para ponderar las infestaciones por *Rattus* spp (32).

En el caso del índice obtenido para medir la abundancia por *Mus musculus* fue menor con relación a la de *Rattus*, pero también fue superior a los valores tolerados para este tipo de estructuras urbanas. Los índices de abundancia obtenidos por los tres ambientes definidos para realizarles ponderaciones y donde se excluyó el ambiente comercial fueron: para el Ambiente 2 (Urbano medio) *Rattus* de 17,5% y *M. musculus* de 5%; para el Ambiente 3 (Influencia del caño) *Rattus* 32,9% y *M. musculus* 71,4% y finalmente para el Ambiente 4 (Urbano bajo) se obtuvo para *Rattus* 46,2% y para *M. musculus* 30%.

Determinación de parámetros biológicos y de infección con *Leptospira* spp en muestras de suero de poblaciones humanas y de roedores capturados.

De las 254 personas a quienes se les tomó muestra de sangre y que dieron su consentimiento informado para participar en el muestreo serológico y a las que se les indagó sobre la presencia de personas con síntomas compatibles de cuadro febril agudo uno de los encuestados manifestó tener síntomas. A este paciente se le revisó por parte de un médico que acompañó las visitas domiciliarias y se le tomó además muestra de sangre total con anticoagulante para realizar cultivo de sangre en medio Fletcher específico para *Leptospira* spp el cual después de ocho semanas de seguimiento fue negativo. Todas las muestras de suero fueron probadas por la prueba de IFI para IgM e IgG (25). Esta prueba fue positiva para 11 pacientes dando una frecuencia de positividad general de 4,3%. A las 11 muestras positivas se les realizó MAT con 11 serovariedades asociadas con roedores y con especies de interés pecuario y mascotas. Los principales títulos se presentaron con la serovariedad Icterohaemorrhagiae en 1: 200, Bratislava en 1: 100 y Tarassovi en 1: 400 (Figura 3). Los habitantes positivos procedían de las manzanas 3, 4, 6, 15, 20, 32 y x5, sin presentar un patrón homogéneo de distribución de positivos.

Fueron capturados 68 roedores, tres de ellos escaparon de la trampa antes de ser anestesiados. Por lo tanto para fines de estudio de parámetros biológicos se obtuvieron datos de 65 roedores. La prueba de MAT realizada a 65 roedores con tres serovariedades Icterohaemorrhagiae, Bratislava y Tarassovi presentó frecuencias de 36,96%, 21,53% y 35,38% respectivamente, obteniéndose títulos desde 1:12,5 hasta 1:200. Este último título fue más frecuente para la serovariedad Icterohaemorrhagiae. La figura 4 presenta los resultados obtenidos para las tres serovariedades.

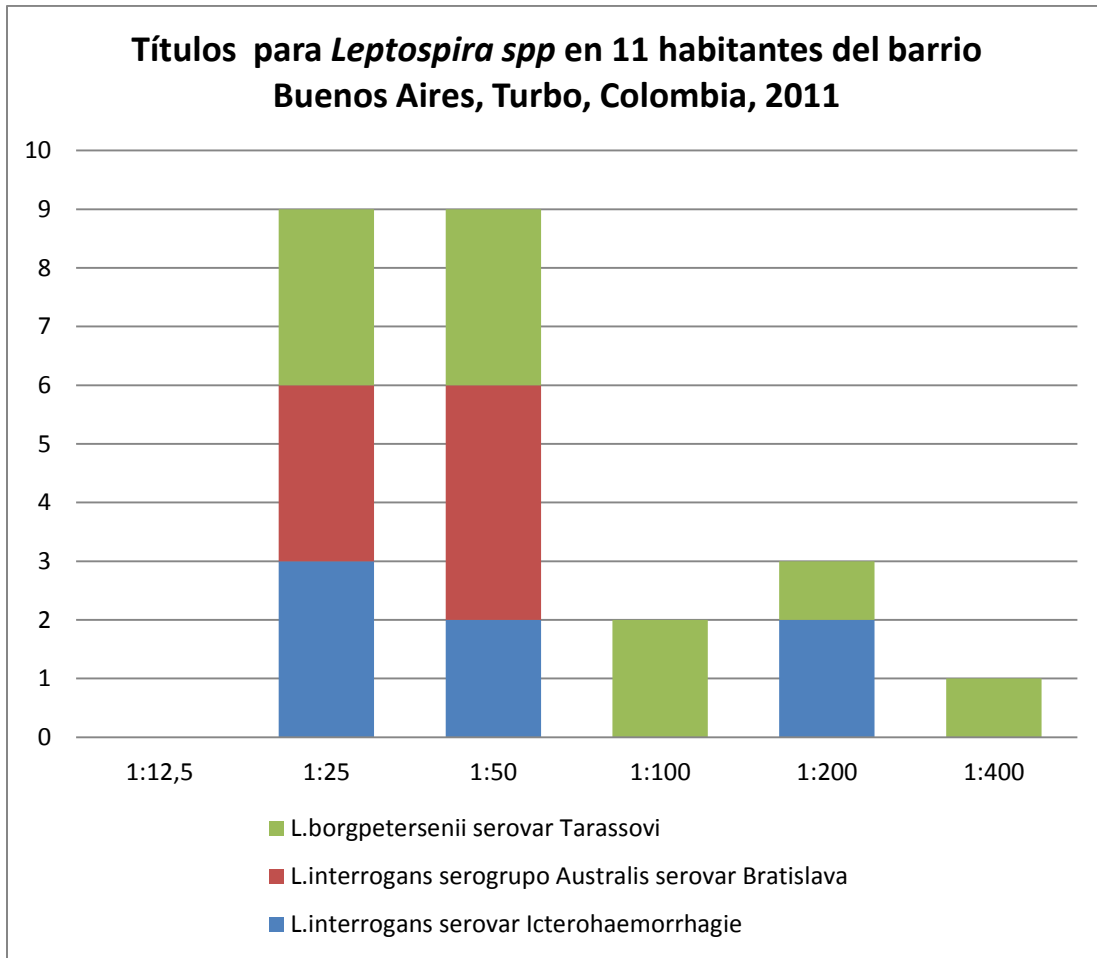


Figura 3: Distribución de títulos de anticuerpos por la prueba de microaglutinación en habitantes del barrio Buenos Aires, Turbo. 2011

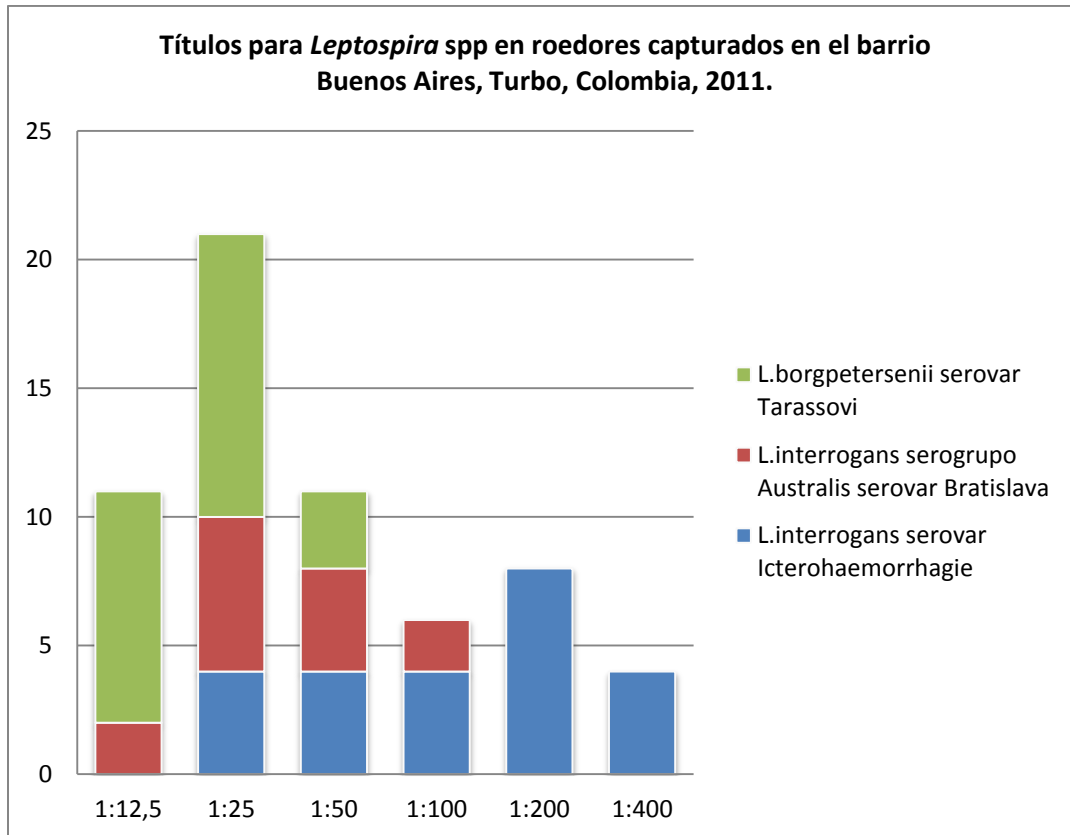


Figura 4. Distribución de títulos de anticuerpos por la prueba de microaglutinación en roedores del barrio Buenos Aires, Turbo. 2011

Por su parte, se obtuvieron por cultivo dos aislados de roedores, en ambos casos la cepa aislada correspondió a *Leptospira interrogans* con número de acceso (NR 074481.1), con un porcentaje de identidad del 100%. El árbol filogenético generado se presenta en la figura 5 en el cual se señala con color rojo.

Determinación de positividad microbiológica de fuentes hídricas

Los 11 cultivos de agua fueron monitoreados semanalmente durante 8-12 semanas. Aquellos positivos por microscopía de campo oscuro, se les realizó PCR para el gen 16S. En total cinco aislados amplificaron a los cuales se les realizó secuenciación, el análisis por Blast se presenta en la tabla 1. Con estas secuencias obtenidas de estos aislados de fuentes hídricas se señalan en el árbol filogenético subrayados con azul en la Figura 5.

Tabla 1. Resultados de porcentaje de alineamiento obtenidos por análisis Blast de las secuencias de *Leptospira* spp obtenidas de cultivos positivos de fuentes de agua. Barrio Buenos Aires, Turbo, 2011.

Nombre	Resultado	Porcentaje (%)
TA1M4	AY631892.1 <i>Leptospira meyeri</i>	100
TA1M5	AY631892.1 <i>Leptospira meyeri</i>	98
TA1M6	AY631892.1 <i>Leptospira meyeri</i>	100
TA3M1	AY631891.1 <i>Leptospira inadai</i>	99
TA3M3	AY792329.1 <i>Leptospira Broomii</i> AY996789.1 <i>Leptospira Broomii</i>	99

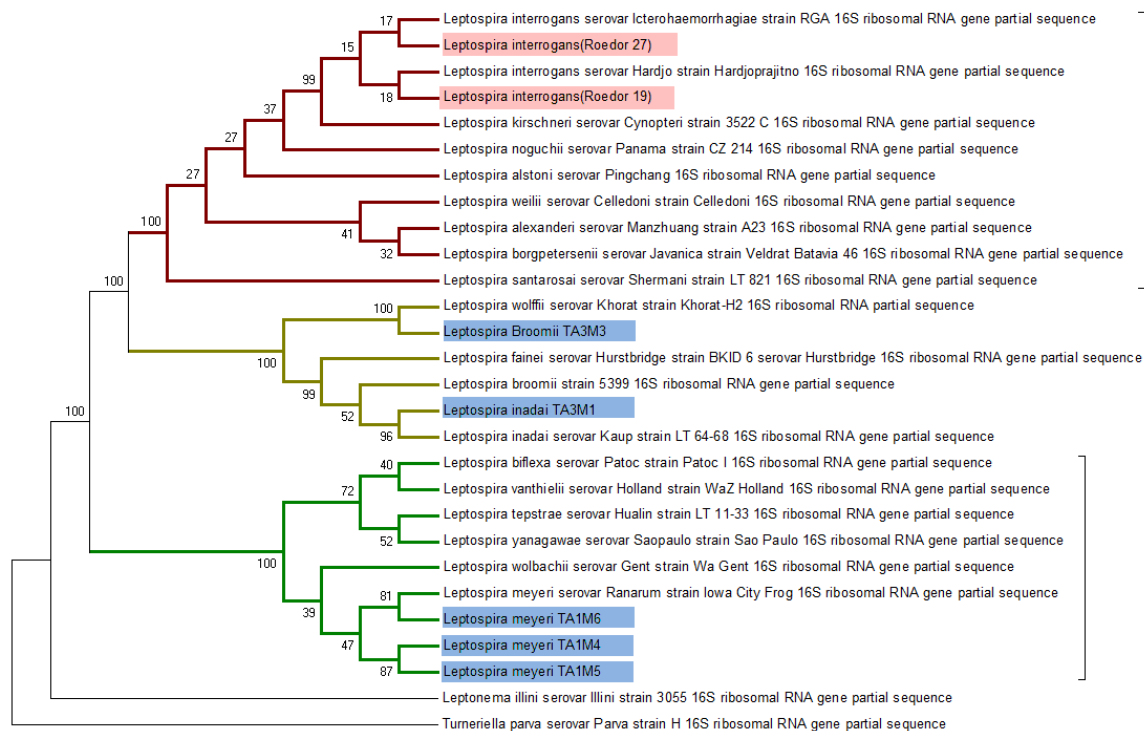


Figura 5. Árbol filogenético con los aislados cinco de agua (azul) y los dos de roedores (rojo). Se marcan las cladas en donde la roja es el grupo de *Leptospira* patógenas, la clada amarilla las especies intermedias y en verde las especies saprófitas. La escala indica la fracción de pares de bases que son diferentes.

El registro geo-referenciado obtenido para determinar la distribución geoespacial lotes baldíos, humanos, roedores y fuentes hídricas positivas para *Leptospira* spp se presenta un mapa temático de distribución espacial de presentación de leptospirosis en el barrio (figura 6). En este se evidencia que los sectores con mayor número de positivos confluyen en los ambientes 3 y 4 los cuales presentan los mayores índices de abundancia para las poblaciones de roedores.

Distribución de humanos positivos, roedores y lotes baldíos
Barrio Buenos Aires
Turbo



Figura 6. Mapa geo-referenciado donde se señala la distribución geoespacial los lotes baldíos (pentágono verde), humanos (círculo naranja), roedores (puntos

pequeños rojos, negros, amarillos) y fuentes hídricas (puntos azules) positivas para *Leptospira* spp. En color azul se señala el ambiente 3 y en color rojo el ambiente 4. Barrio Buenos Aires, Turbo-2011.

Discusión

Los resultados de este estudio permiten concluir que en la zona de estudio del municipio de Turbo se presenta el complejo leptospirosis/roedores demostrado con indicadores claros y objetivos su interacción con la población humana que allí habita. Esta interacción fue evidenciada igualmente por los habitantes del barrio quienes indican la presencia frecuente de roedores tanto en áreas peri como domiciliarias; situación que se corrobora con los índices de abundancia relativa de roedores que mostró en todos los ambientes, niveles superiores a los tolerables es decir índices de abundancia mayores al 5% y para las tres especies de roedores sinantrópicos.

En este sentido, en los ambientes en donde confluyen las bajas condiciones de saneamiento y las zonas inundables (ambientes 3 y 4) se constituyeron en los sectores más críticos del área de trabajo, establecido por sus índices de abundancia relativa de roedores, positividad de roedores y aguas con circulación de los tres grupos de especies de *Leptospira* spp. Hasta donde llega nuestro conocimiento, no disponemos de reportes de situaciones comparables de infestación y de circulación de los tres grupos de espiroqueta, en poblaciones humanas de vulnerabilidad similar, pero si se reconoce que a nivel latinoamericano regiones de Brasil han presentado incidencias de > 12.000 casos por año y tanto brotes como epidemias asociadas a la enfermedad, en donde se ubican a los roedores como la principal fuente de infección, asociado a las condiciones de viviendas precarias y periodos de lluvias e inundación (11,33–39).

En Perú igualmente la enfermedad ha sido asociada a bajas condiciones de sanidad, inundaciones y presencia de roedores domiciliarios con hasta un 30% de casos de positividad en anticuerpos a serovares circulantes en humanos y en roedores de especies *Rattus* spp (40,41). Leptospirosis no es solo asociada a roedores en Perú, sino también murciélagos (42) y a aguas superficiales como lo demuestra el estudio realizado por Ganoza CA. en el 2006, donde la enfermedad severa en el país es asociada a aguas superficiales en zonas urbanas y rurales con un 75% y 78% de positividad respectivamente (14). Las zonas inundables y el cambio climático comprometen y proporcionan a su vez mayor concentración de aguas superficiales sin drenaje que ha sido asociado en gran medida a los problemas de brotes por leptospirosis en este país (14,43). El saneamiento y la disposición de basuras en los países en desarrollo en general y alcantarillados en mal estado han demostrado promover la proliferación de roedores (11,43) y por ende la circulación de la enfermedad como se observa a su vez en el presente estudio.

Existe un predominio de *R. norvegicus* que contrariamente a lo esperado muestra un hábitat domiciliario más acentuado del que caracteriza a esta especie en otros

lugares de estudio (25), esta especie se ha encontrado en otros estudios como la responsable del mantenimiento y diseminación de la bacteria en grandes cantidades, favorecida por la presencia de inundaciones y alcantarillados en mal estado (38). Se determina que tanto las especies de roedores como los humanos de la zona de estudio presentan niveles de anticuerpos, que se correlacionan con un posible reto o exposición constante con ambientes de suelos y aguas donde se registraron por métodos moleculares especies de *Leptospira* no sólo patógenas sino también de patogenicidad intermedia, esto evidencia una epidemiología de la zona compleja y variable. *Leptospira* de especies intermedias ha causado claramente la enfermedad en humanos como revelan diversos estudios (44,45), pero lo que las hace peligrosas es su resistencia a medios diversos ya que expresan genes de resistencia medioambiental que comparten con las especies saprófitas de las mismas, pudiéndose mantener por periodos prolongados en aguas y suelos (6,44), lo contrariamente observado en *L. borgpetersenii* que posee transmisión directa (46).

En el caso de los humanos quienes presentaron títulos para los serovares como Pomona, Canicola, Hardjo y Grippotyphosa, se evidenciaron fuentes de infección de diferentes especies de la bacteria y de diferentes orígenes según especificidad por serovar anteriormente descrita (1,3,47,48). Sin embargo, los títulos en los cuales se presentó mayor frecuencia fue en el serovar Icterohaemorrhagiae en 1:200, Bratislava en 1:100 y Tarassovii en 1:400; similar a lo presentado en roedores, señalándolos como una importante fuente de infección para los humanos aunque no necesariamente sea la única, puesto que estos serovares han sido asociados a otras especies de animales domésticos como equinos y suinos (3), convirtiendo a los roedores en un posible transmisor centinela de la enfermedad en la zona. Sin embargo, al ser esta área una zona urbana que basa su actividad económica en la agricultura y pecuaria en sus alrededores, es posible que tanto roedores como humanos tengan otras fuentes de infección no contempladas en este estudio.

Se obtuvieron dos aislados patógenos provenientes de roedor, ambos compatibles por alineamiento con *L. interrogans* (NR.074481.1), estos roedores se capturaron en el ambiente 3 y 4, zonas con mayor posibilidad de contacto roedor-humano por condiciones habitacionales del área, demostrando el peligroso papel que pueden jugar estos roedores en la transmisión de la bacteria, puesto que estos tienen contacto con aguas y posibilidad de ingresar a las viviendas, como se puede comprobar con el caso de mortalidad del estudio. Encontrar este serovar en estos roedores, puede indicar y corroborar que a esta zona ingresan cepas de otro origen animal; pero también puede indicar una alta circulación de especies y serovares en la zona, aumentando la necesidad de realizar un estudio epidemiológico en donde se contemplen mayores factores de riesgo y fuentes de infección entre los que se pueden inferir la circulación de fauna silvestre y de murciélagos reconocidos agentes transmisores de leptospiras en otras regiones geográficas como la amazonía peruana (42).

En fuentes hídricas de la zona se aislaron tres cepas compatibles con las especies saprófitas *L. meyeri* (AY631892.1) Sin embargo, existen serovares de *L. meyeri* considerados serovares patógenos (48) y 2 cepas compatibles con las especies intermedias *L. broomii* (AY792329.1) y *L. inadai* (AY631891.1), evidenciando el papel del agua en la transmisión, las demás especies de *Leptospira* pueden permanecer en agua hasta por 343 días en condiciones ideales (5). *L. inadai* y *L. broomii* ha sido reportada como causante de enfermedad en humanos y animales (44,45), donde *L. inadai* ha sido aislada de roedores de la especie *R. Rattus*, perros, cabras, búfalos y humanos en otros países y *L. broomii* de humanos con la enfermedad (45,50–55), esta situación hace inferir que el agua está contaminada o ha sido posiblemente contaminada con la bacteria de origen ya sea de roedor o de especies animales diferentes. El hallazgo de estas dos especies reafirma que existen otras fuentes de infección y la gravedad que hay en la región al tenerlas en el agua común, que puede ser manipulada por cualquiera de los habitantes del barrio. Los caños al no ser canalizados favorecen el contacto de los animales y humanos con el agua. Esta situación se agrava al saber que el municipio de Turbo es una zona con riesgo de inundación constante y con reporte de inundaciones en el año 2010 y 2011 (56). Estos caños pueden aumentar su tamaño y caudal inundando zonas periféricas, que en el caso del barrio sería los ambientes 3 y 4 en donde se detectó mayor presencia de anticuerpos y de infestación de roedores.

Se encontró un patrón espacial entre los resultados obtenidos en el estudio, demostrando que la presencia de anticuerpos y los aislamientos, se encuentran relacionadas con zonas de bajas condiciones habitacionales que facilitan la presencia de roedores. Estos factores de riesgo han sido evidenciados también en zonas urbanas de Brasil y Perú (11,33,34,38).

En conclusión, los resultados del trabajo permiten concluir que en el Barrio Buenos Aires se presenta la asociación epidemiológica entre roedores/leptospira/ambiente, con indicadores altos de la presencia de la infección y la posibilidad de poseer otras fuentes para humanos y animales. Lo anterior justifica emprender estudios complementarios que permitan definir el fenómeno epidemiológico con más exactitud en la zona, buscando otros tipos de serovares y aislamientos de la bacteria e incrementando la búsqueda de posibles fuentes de infección y factores de riesgo. El estudio permite también sugerir una acción de intervención en los caños para la eliminación de la bacteria, control eficaz de roedores y manejo adecuado con fuertes mensajes educativos hacia la población para el manejo de basuras y residuos en la zona.

Referencias

1. Faine S. *Leptospira* y leptospirosis. Boca Raton: CRC Press; 1994.
2. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* enero de 2010;140(3-4):287-96.

3. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* diciembre de 2003;3(12):757-71.
4. Levett P. Leptospirosis. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*; 2001.
5. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int. Microbiol.* marzo de 2004;7(1):35-40.
6. Barragan VA, Mejia ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, et al. Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from Surface Water. *Curr Microbiol* [Internet]. abril de 2011; Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479795>
7. Zaïtsev SV, Chernukha IG, Evdokimova OA, Belov AS. [Survival rate of *Leptospira pomona* in the soil at a natural leptospirosis focus]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* febrero de 1989;(2):64-8.
8. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpiboon R, et al. A Dominant Clone of *Leptospira interrogans* Associated with an Outbreak of Human Leptospirosis in Thailand. Picardeau M, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. octubre de 2007;1(1):e56.
9. Agudelo-Flórez P, Restrepo-Jaramillo BN, Arboleda-Naranjo M. [Leptospirosis in Uraba, Antioquia, Colombia: a seroepidemiological and risk factor survey in the urban population]. *Cad Saude Publica*. septiembre de 2007;23(9):2094-102.
10. Riley LW, Ko AI, Unger A, Reis MG. Slum health: Diseases of neglected populations. *BMC International Health and Human Rights*. 2007;7(1):2.
11. Maciel EAP, de Carvalho ALF, Nascimento SF, de Matos RB, Gouveia EL, Reis MG, et al. Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(1):e154.
12. Szyfres B. Leptospirosis as an animal and public health problem in Latin America and the Caribbean area. *Bull Pan Am Health Organ*. 1976;10(2):110-25.
13. Lomar AV, Diament D, Torres JR. Leptospirosis in Latin America. *Infect. Dis. Clin. North Am*. marzo de 2000;14(1):23-39, vii-viii.
14. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, Segura ER, et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular

analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. PLoS Med. agosto de 2006;3(8):e308.

15. Epstein PR, Calix Pena O, Blanco Racedo J. Climate and disease in Colombia. Lancet. 11 de noviembre de 1995;346(8985):1243-4.

16. Sebek Z, Sixl W, Valova M, Marth E, Köck M, Reinthaler FF. Serological investigations for leptospirosis in humans in Columbia. Geogr Med Suppl. 1989;3:51-60.

17. Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL. [Seroprevalence of *Leptospira* infection in habitants of peripheral neighborhoods in Cali, Colombia]. Biomedica. junio de 2006;26(2):250-7.

18. Góngora A, Parra J, Aponte L, Gómez L. [Seroprevalence of *Leptospira* spp in population groups of Villavicencio, Colombia]. Rev Salud Publica (Bogota). 2008;10(2):269-78.

19. Agudelo-Flórez P, Londoño AF, Quiroz VH, Angel JC, Moreno N, Loaiza ET, et al. Prevalence of *Leptospira* spp. in urban rodents from a groceries trade center of Medellin, Colombia. Am J Trop Med Hyg. noviembre de 2009;81(5):906-10.

20. Padmanabha H, Hidalgo M, Valbuena G, Castaneda E, Galeano A, Puerta H, et al. Geographic variation in risk factors for SFG rickettsial and leptospiral exposure in Colombia. Vector Borne Zoonotic Dis. octubre de 2009;9(5):483-90.

21. Arboleda-Naranjo. Reprote suministrado por el instituto colombiano de medicina tropical. Apartadó: ICMT; 2010. Report No.: 3.

22. Nuestro municipio - Turbo [Internet]. [citado 22 de noviembre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.turbo-antioquia.gov.co/nuestromunicipio.shtml>

23. Economía de Turbo. Nuestro municipio > Información general - Turbo [Internet]. 2012 [citado 23 de agosto de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.turbo-antioquia.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mlxx-1-&m=f#ecologia>

24. Coto, H. Actualización en biología y control de ratas sinantrópicas. 1.^a ed. Buenos Aires: Estudios Gestalt; 2007.

25. Agudelo-Flórez P, Restrepo M, Lotero MA. [Evaluation of indirect immunofluorescence assay for diagnosis of human leptospirosis]. Biomedica. junio de 2006;26(2):216-23.

26. World Health Organization, International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control 2003. 2003;122.
27. Cespedes M. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2007; 24(1): 20-26.
28. Ahmed N, Devi SM, Valverde M e L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006;5:28.
29. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 1 de noviembre de 2007;23(21):2947-8.
30. Devereux J, Haeberli P, Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res. 11 de enero de 1984;12(1 Pt 1):387-95.
31. Arrieta T, Marco, Soto Z, Rodolfo, Gonzales R, Rodolfo et al. Características de la población de roedores y pulgas en áreas de diferente riesgo para peste de tres provincias del departamento de Piura-Perú. 2001;18:90-7.
32. Jackson M. Disease and diversity in history. Soc Hist Med. agosto de 2002;15(2):323-40.
33. Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho ALF, Aires TSF, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, et al. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. Emerging Infectious Diseases. marzo de 2008;14(3):505-8.
34. Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalofonos I, et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. Am. J. Trop. Med. Hyg. mayo de 2002;66(5):605-10.
35. WHO. Informal Consultation on Global Burden of Leptospirosis: Methods of Assessment. 2006.
36. Clement J, Neild G, Hinrichsen SL, Crescente JA, Van Ranst M. Urban leptospirosis versus urban hantavirus infection in Brazil. The Lancet. diciembre de 1999;354(9194):2003-4.
37. Ullmann L, Langoni H. Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2011;17(2):119-29.

38. Dias JP, Teixeira MG, Costa MCN, Mendes CMC, Guimarães P, Reis MG, et al. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. octubre de 2007;40(5):499-504.
39. Tassinari WS, Pellegrini DCP, Sá CBP, Reis RB, Ko AI, Carvalho MS. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop. Med. Int. Health*. abril de 2008;13(4):503-12.
40. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, et al. Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique *Leptospira* Associated with a *Rattus* Species Reservoir in the Peruvian Amazon. *Picardeau M*, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2 de abril de 2008;2(4):e213.
41. Johnson MAS, Smith H, Joseph P, Gilman RH, Bautista CT, Campos KJ, et al. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerging Infect. Dis.* junio de 2004;10(6):1016-22.
42. Bunnell JE, Hice CL, Watts DM, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(5-6):255-8.
43. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* octubre de 2010;104(10):631-8.
44. Schmid GP, Steere AC, Kornblatt AN, Kaufmann AF, Moss CW, Johnson RC, et al. Newly recognized *Leptospira* species («*Leptospira inadai*» serovar lyme) isolated from human skin. *J. Clin. Microbiol.* septiembre de 1986;24(3):484-6.
45. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* marzo de 2006;56(Pt 3):671-3.
46. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 26 de septiembre de 2006;103(39):14560-5.
47. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Micro.* octubre de 2009;7(10):736-47.
48. Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* septiembre de 2009;9(5):760-8.

49. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Vet Microbiol* [Internet]. 5 de marzo de 2011 [citado 18 de junio de 2011]; Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440384>
50. Gangadhar NL, Rajasekhar M, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF. Reservoir hosts of *Leptospira inadai* in India. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* diciembre de 2000;19(3):793-9.
51. Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Weyant RS, et al. Identification of *Leptospira inadai* by continuous monitoring of fluorescence during rapid cycle PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* marzo de 1998;21(1):89-96.
52. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* abril de 1999;49 Pt 2:839-58.
53. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family *Leptospiraceae* with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1 de octubre de 1987;37(4):407 -415.
54. Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, et al. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* octubre de 2008;58(Pt 10):2305-8.
55. Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi A-A, Gouya MM, et al. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infect. Genet. Evol.* marzo de 2010;10(2):273-7.
56. Ministerio de medio ambiente y desarrollo sostenible. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales [Internet]. [citado 23 de agosto de 2012]. Recuperado a partir de: <http://institucional.ideam.gov.co/jsp/loader.jsf?IServicio=Publicaciones&ITipo=publicaciones&IFuncion=loadContenidoPublicacion&id=1011>